

doi: 10.3969/j.issn.1009-0002.2009.01.005

研究报告

胸腺素 $\alpha 1$ 的乙酰化修饰不依赖于乙酰转移酶 RimL张旭^{1,2}, 苗林², 方宏清², 戴红梅², 李树龙², 沈明山¹, 陈惠鹏²

1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071

[摘要] 目的: 考察大肠杆菌乙酰转移酶 RimL 对胸腺素 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$) 乙酰化修饰的影响。方法: 构建含 500 bp 同源臂的卡那抗性基因打靶片段, 利用 Red 同源重组系统, 使大肠杆菌 BL21(DE3) 的 *rimL* 基因插入失活, 随后导入质粒 pCP20 去除抗性基因, 构建突变菌株 *rimL*-BL21(DE3); 将重组质粒 pET-T $\alpha 1$ -L12 分别转入出发菌株和突变菌株中进行表达, 经固定金属离子亲和和层析和反向高效液相层析后, 将所得纯品进行质谱分析, 精确测定相对分子质量。结果: PCR 鉴定结果证明成功敲除 *rimL* 基因; 质谱结果表明, *rimL* 基因敲除菌中所表达的 T $\alpha 1$ -L12 融合蛋白与出发菌株一样, 均有部分乙酰化修饰。结论: T $\alpha 1$ 的乙酰化修饰并不依赖于 RimL。

[关键词] 胸腺素 $\alpha 1$; 乙酰化; 乙酰转移酶 RimL; Red 重组

[中图分类号] Q78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-0002(2009)01-0015-04

The Acetylation of Thymosin $\alpha 1$ is Independent on RimL in *Escherichia coli*ZHANG Xu^{1,2}, MIAO Lin², FANG Hong-Qing², DAI Hong-Mei²,LI Shu-Long², SHEN Ming-Shan¹, CHEN Hui-Peng²

1. College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005; 2. Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071; China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of RimL, a N-terminal acetyltransferase of *E.coli*, on thymosin $\alpha 1$ (T $\alpha 1$) acetylation. **Methods:** A kanamycin cassette with two 500 bp long arms homologous to the regions around *rimL* as the replacement fragment was electroporated into cells, in which the Red recombinant functions was induced. Subsequently, the plasmid pCP20 was transformed to eliminate the kanamycin resistant gene. The plasmid pET-T $\alpha 1$ -L12 was transformed into the original and mutant strains respectively. The expressed fusion protein T $\alpha 1$ -L12 was purified by IMAC and RP-HPLC. The accurate molecular weight of the fusion protein was measured by Q-TOF-MS. **Results:** The gene *rimL* was inactivated by insertion of the replacement fragment successfully. According to the MS results, the fusion protein T $\alpha 1$ -L12 was still partly acetylated when it was expressed in the mutant strains as in the original strains. **Conclusion:** T $\alpha 1$ acetylation was independent on RimL.

[Key words] thymosin $\alpha 1$; acetylation; acetyltransferase RimL; Red recombinant

胸腺素 $\alpha 1$ (thymosin $\alpha 1$, T $\alpha 1$) 是动物或人胸腺组织分泌的一种酸性多肽激素, 由 28 个氨基酸残基组成, 等电点为 4.2, 相对分子质量为 3 108。T $\alpha 1$ 有着广泛的临床用途^[1], 但是其生产工艺却不尽成熟, 目前市场上出售的胸腺素主要是从小牛胸腺中提取的胸腺素混合物或化学合成产品。从动物胸腺中提取不仅来源困难, 而且有效成分含量很低, 使得探讨其效果和作用机理变得很困难。而利用化学合成方法生产 T $\alpha 1$ 不但存在产量问题, 还涉及到产物的后加工, 特别是 N α -乙酰化修饰。因此, 许多研究者的研究重点是利用基因工程方法表达 T $\alpha 1$ 。将 T $\alpha 1$ 在大肠杆菌中融合表达能有效提高得率, 且不影响其生物活性^[2-5], 但是 N α -乙酰化修饰的问题始终没有得到很好的解决。如果能够找到影响乙酰化修饰的关键酶, 可能将推进利用基因工程手段表达这种多肽药物的研究进展。

在大肠杆菌种中有 3 种已知的乙酰转移酶基因 *rimI*, *rimJ* 和 *rimL*^[6-8]。考虑到 RimL 的作用底物 L12 的 N α 氨基酸与 T $\alpha 1$ 一样, 均为 Ser, 因而该酶很有可能与 T $\alpha 1$ 在大肠杆菌内的乙酰化修饰有关。我们利用 Red 同源重组技术^[9]敲除大肠杆菌 BL21(DE3) 的

rimL 基因, 以便探讨该基因是否为 T $\alpha 1$ 在大肠杆菌内发生乙酰化修饰的关键酶基因。

1 材料与方法

1.1 材料

宿主菌大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 为本室保存; 质粒 pKD4、pCP20 由军事医学科学院生物工程研究所王芃博士惠赠; pKOBEG 由 Institut Pasteur 提供^[9]; 重组质粒 pET-T $\alpha 1$ -L12 由本室构建。

质粒小量快速提取试剂盒购自北京博大泰克生物公司; 离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技公司; 各种工具酶购自 TaKaRa 公司; 亲

[收稿日期] 2008-05-13

[作者简介] 张旭(1983-), 女, 硕士研究生

[通信作者] 方宏清, (E-mail) fanghongqing@yahoo.com.cn

署名单位为共同第一作者单位

和层析柱 HisTrap HP 购自 Amercham 公司; 反向高效液相层析柱 Hypersil 300Å C8 购自大连依力特公司。

1.2 引物设计

P1: 5' GAAACATGGCTGATCAGTAITTC3';
P2: 5' CAGCTCCAGCTACACATCGCTTACTTTTATCGITTCAGTCAT3';
P3: 5' GGACCATGGCTAATTCCTATCGCGGTAATTATCGATTCACAATAA3';
P4: 5' AAGGGITAGCGCTCG3';
J11: 5' GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC3';
J12: 5' ATGGGAATTAGCCATGGTCC3';
R5: 5' GGAATTCATATGACTGAAACGATAAAAAGTAACCGAATC3';
R3: 5' CCGGATCCCTATTATTGTGCATCGATAATACCCG3';
J6: 5' GCGGCTTTTTTAACAACCTG.

1.3 线性打靶片段的制备

1.3.1 上、下游同源臂和卡那抗性基因的扩增 以大肠杆菌 DH5α 基因组为模板, 分别以 P1 和 P2、P3 和 P4 为引物, 扩增 *rimL* 上下游各 500 bp 的片段作为同源臂; 以 pKD4 质粒为模板, J11 和 J12 为引物, 扩增约 1 500 bp 的卡那霉素抗性基因片段。以上扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收。

1.3.2 线性打靶片段的拼接 以 *rimL* 上游 500 bp 片段和卡那霉素抗性基因片段为模板, P1 和 J12 为引物, 将两者拼接, 回收约 2 000 bp 的片段; 再以此拼接的片段和 *rimL* 下游 500 bp 的片段为模板, P1 和 P4 为引物, 扩增全长的线性打靶片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收约 2 500 bp 的片段。

1.4 Red 重组酶的诱导表达和感受态细胞的制备

将编码 Red 同源重组系统酶基因的质粒 pKOBEG 用 CaCl₂ 法转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 在含有 50 μg/mL 氯霉素的 LB 培养基中 30℃ 振荡培养过夜; 转接 1 mL 菌液于 50 mL 带有同样浓度氯霉素的 LB 培养基中, 30℃ 振荡培养至 D_{600nm} 达 0.2~0.4; 加入终浓度为 0.2% 的 L-阿拉伯糖进行诱导至 D_{600nm} 达 1.0; 4 000 r/min, 4℃ 离心 10 min 收集菌体, 用去离子水洗 3 次; 将菌体重悬于 150 μL 预冷的 10% 甘油中, 取 50 μL 用于电击转化^[10]。

1.5 电击转化线性打靶片段

取 100~300 ng 回收的打靶片段与 50 μL 感受态细胞混合, 吸入 0.1 cm 的 Bio-Rad 电转杯进行电击, 设置电压 1.8 kV。电击后迅速加入 0.5 mL 冰冷的 LB 培养基, 37℃ 振荡培养 60 min, 取 100 μL 菌液涂布于卡那霉素抗性平板上, 37℃ 过夜培养。

1.6 菌落 PCR 鉴定

方案①: 用与 *rimL* 两端同源的 R5 和 R3 为引物, 分别以大肠杆菌 BL21(DE3) 和 *rimL-kan*BL21(DE3) 为模板进行 PCR。方案②: 用与 *rimL* 上游同源的 J6 以及与卡那霉素抗性基因同源的

J12 为引物, 分别以大肠杆菌 BL21(DE3) 和 *rimL-kan*BL21(DE3) 为模板进行 PCR。鉴定后挑选阳性克隆, 于 37℃ 传代培养去除质粒 pKOBEG。

1.7 卡那霉素抗性基因的去留

制备 *rimL-kan*BL21(DE3) 的电转感受态细胞, 将质粒 pCP20 电转入该感受态中, 于含氨苄青霉素的 LB 平板上筛选重组子, 然后转接至无抗性的 LB 培养基中, 42℃ 培养 5 h, 在无抗性平板上划线, 对所得单菌落进行氨苄青霉素和卡那霉素敏感检测, 对两者均敏感的克隆即去除了 pCP20 质粒和卡那霉素抗性基因, 为 *rimL*-BL21(DE3), 最后采用上述方案①进行 PCR 鉴定。

1.8 Tα1-L12 融合蛋白的表达和纯化

1.8.1 工程菌的构建和融合蛋白的诱导表达 将质粒 pET-Tα1-L12 转化到出发菌和 *rimL*-BL21(DE3) 中, 构建了 2 株工程菌, 分别命名为大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-Tα1-L12 和 *rimL*-BL21(DE3)/pET-Tα1-L12。将 2 株工程菌分别接入含有 100 μg/mL 氨苄青霉素抗性的液体 LB 培养基中, 37℃ 培养生长过夜, 按 5% 的比例接入含有乳糖的诱导培养基中, 37℃ 诱导 12 h。

1.8.2 融合蛋白的纯化 在每克湿菌中加入 10 mL 50 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 缓冲液 (pH7.0) 悬浮菌体, 超声破菌 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 获取以可溶形式表达的胸腺素融合蛋白。将破菌上清补加 0.5 mol/L NaCl 上 HisTrap HP 亲和层析柱, 收集峰尖的样品, 上 Hypersil 300Å C8 柱经反向高效液相分析, 收集样品, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.9 质谱鉴定

纯化后的样品冻干后送军事医学科学院仪器测试分析中心进行 Q-TOF-MS 分析, 精确测定蛋白的相对分子质量, 鉴定其是否乙酰化。

2 结果

2.1 *rimL* 突变株的构建

将含有同源臂的卡那霉素抗性基因打靶片段电转入已诱导表达了重组酶的 BL21(DE3) 感受态细胞中, 于 37℃ 在卡那霉素抗性 LB 平板上筛选重组子, 采用上述方案①、②进行菌落 PCR 鉴定。方案①中出发菌的扩增条带约 500 bp, 筛选的重组子中扩增的条带位于 1 000~2 000 bp, 与插入卡那霉素抗性基因后预计的扩增大小相符 (图 1)。方案②中, 出发菌本身没有卡那霉素抗性基因序列, 因此没有 J12 结合的位置, 无法扩增出条带, 而待筛选的重组子扩增出 1 000~2 000 bp 条带, 说明在 *rimL* 上游和 J12 结合的位置间存在卡那霉素抗性基因 (图 2)。由此, 可以初步

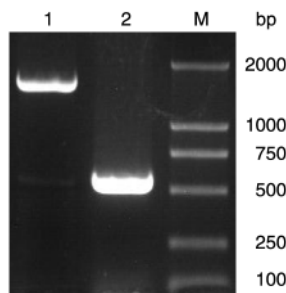


图1 方案①菌落 PCR 鉴定结果
M: DL2000; 1: *rimL-kan*BL21(DE3) 菌落 PCR 产物;
2: 对照 BL21(DE3) 菌落 PCR 产物

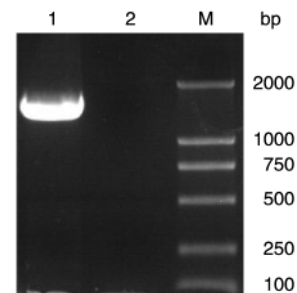


图2 方案②菌落 PCR 鉴定结果
M: DL2000; 1: *rimL-kan*BL21(DE3) 菌落 PCR 产物;
2: 对照 BL21(DE3) 菌落 PCR 产物

确定 *rimL-kan*^rBL21(DE3) 构建成功。

质粒 pCP20 能表达 FLP 位点特异性重组酶, 通过识别 FRT 位点, 介导 2 个同向 FRT 位点之间片段的切除。因此, 将 pCP20 转化至上一步筛选所得的 *rimL-kan*^rBL21(DE3) 阳性克隆中, 去除卡那霉素抗性基因。经筛选后得到的对氨苄青霉素和卡那霉素均敏感的菌株则为去除 pCP20 质粒和卡那霉素抗性基因的 *rimL* 敲除菌。再次利用方案①做菌落 PCR 鉴定, 结果如图 3, 卡那霉素抗性基因已被去除。

2.2 T α 1-L12 融合蛋白的诱导表达

由图 4 可以看出, 经乳糖诱导后 T α 1-L12 融合蛋白在出发菌和 *rimL* 基因敲除菌株中均有表达。超声破菌后, 将上清和沉淀样品进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示在表达量和可溶性方面敲除菌株和出发菌均保持一致。

2.3 T α 1-L12 融合蛋白的纯化

T α 1-L12 融合蛋白在出发菌和敲除菌中表达后的破菌上清经亲和层析、反向高效液相分析后, SDS-PAGE 检测结果如图 5。经反向高效液相洗脱得到的样品条带比较弱, 但合并几管收集样品, 真空浓缩后可达到质谱分析的标准。

2.4 质谱鉴定

将反向高效液相层析洗脱下来的较纯的几管样品混合, 冻干成粉末后进行质谱分析, 精确测定相对分子质量。在出发菌中表达的 T α 1-L12 融合蛋白的质谱分析如图 6 所示, 主要有相对分子质量为 13 199.8 和 13 242.0 的 2 个峰, 前者符合 T α 1-L12 的理论预测相对分子质量, 而后者在此基础上增加了 42.2, 符合乙酰化修饰后所增加的相对分子质量。结果表明, 在出发菌中所

表达的 T α 1-L12 融合蛋白是有部分乙酰化修饰的。

T α 1-L12 融合蛋白在 *rimL* 突变菌株中表达、纯化后的质谱鉴定结果如图 7, 在 *rimL* 突变菌株中表达的经乙酰化修饰的 T α 1-L12 融合蛋白所占比例要比出发菌株高, 主峰为相对分子质量 13 241.6 的乙酰化修饰峰, 其次才是 13 199.6 的非乙酰化修饰峰。2 个峰均带有一定的氧化修饰和加钠离子的修饰, 但不影响对结果的分析。该质谱结果说明 RimL 不是负责 T α 1 乙酰化修饰的酶。

3 讨论

T α 1 是一种生物反应调节因子, 主要起 T 淋巴系统免疫增强剂的作用, 对 NK 细胞也有协同作用。T α 1 在联用干扰素治疗乙型肝炎与丙型肝炎、联用化学疗法或放射疗法或白介素-2 治

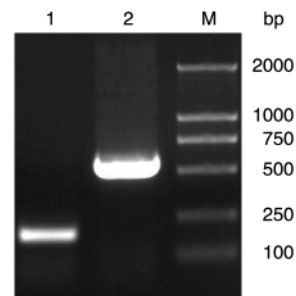


图 3 *rimL-kan*^rBL21(DE3) 菌落 PCR 鉴定结果
M: DL2000; 1: *rimL-kan*^rBL21(DE3) 菌落 PCR 产物;
2: 对照 BL21(DE3) 菌落 PCR 产物

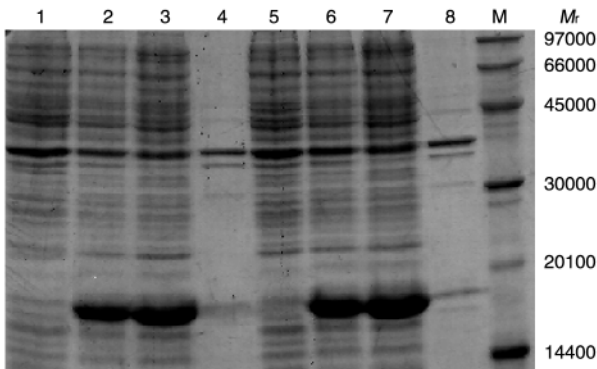


图 4 乳糖诱导 T α 1-L12 表达的 SDS-PAGE 分析
M: 低分子量蛋白标准; 1~4: BL21(DE3); 5~8: *rimL- BL21*(DE3); 1~4, 5~8 从左至右依次为未诱导全菌蛋白对照、诱导后的全菌蛋白、诱导后上清中的蛋白、诱导后沉淀中的蛋白

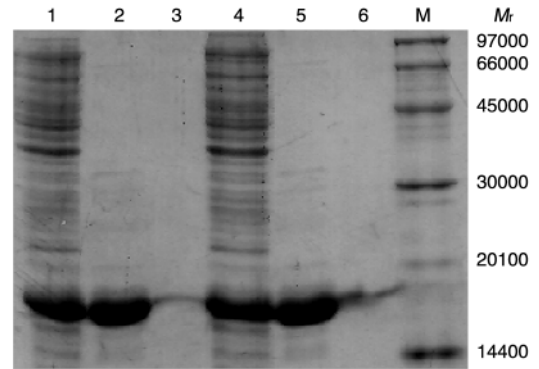


图 5 T α 1-L12 融合蛋白的纯化
M: 低分子量蛋白标准; 1~3: BL21(DE3); 4~6: *rimL- BL21*(DE3); 1~3, 4~6 从左至右依次为破菌后的全菌蛋白上清液、亲和层析峰尖、反向高压液相峰尖

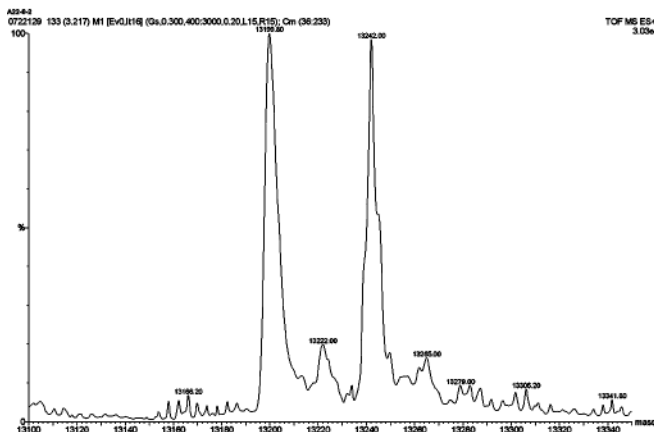


图 6 T α 1-L12 在 BL21(DE3) 中表达的相对分子质量测定

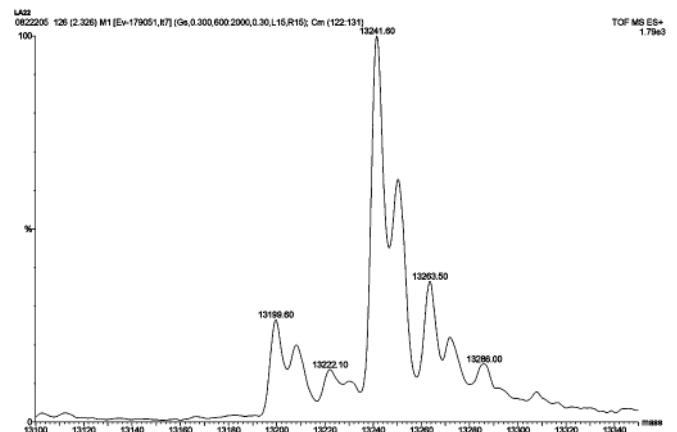


图 7 T α 1-L12 在 *rimL- BL21*(DE3) 中表达的相对分子质量测定

疗非小细胞肺癌和恶性黑色素瘤、联用叠氮胸苷和干扰素治疗免疫缺陷综合征等临床试验中都显示了良好的治疗效果^[1]。化学合成的 T α 1 已在中国、美国、日本等多个国家获准临床应用,用于治疗乙型肝炎、丙型肝炎和肺癌等疾病。我国临床需求量很大,但进口的 T α 1 价格昂贵。如能进一步降低生产成本,作为抗病毒、肿瘤治疗药物,T α 1 在国内的市场将会进一步扩大。目前国内外均采用化学合成方法生产 T α 1,但成本较高。曾有多人尝试利用基因工程技术表达 T α 1,但无论采用融合表达还是串联表达,都不能获得具有完全 N 端乙酰化修饰的 T α 1^[2-5]。

T α 1 分子较小,利用基因工程手段直接表达、纯化有一定困难,因此我们将 T α 1 的 C 端与不同的载体蛋白融合,在大肠杆菌中表达该融合蛋白。经表达、分离纯化及质谱鉴定,均发现有部分融合蛋白存在乙酰化修饰,而且该修饰位于 T α 1 的 N 端 Ser 残基上(未发表结果)。若能找到与 T α 1 的 N 端乙酰化修饰相关的酶,将有助于进一步提高 T α 1 乙酰化修饰的程度。

已知的大肠杆菌 N 端乙酰转移酶有 RimI、RimJ 和 RimL^[6-8],分别与核糖体蛋白 S18(N-Ala)、S5(N-Ala)和 L12(N-Ser)的 N 端 Ala 或 Ser 残基乙酰化有关。此外,根据生物信息学分析,大肠杆菌基因组中有一些未知功能基因可能也具有乙酰转移酶活性。我们曾对大肠杆菌的 N 端乙酰转移酶 RimL 进行了研究,发现该酶仅由 1 种亚基组成,在体外可以催化 L12 的 N 端乙酰化修饰,并且还可以催化 L12 的 2 种突变体(S1A 和 I2D)的 N 端乙酰化修饰^[10]。由于 RimL 可以对 N 端残基为 SD 的蛋白质进行乙酰化修饰,而 T α 1 的 N 端 2 个残基也为 SD,因此推测 RimL 是 T α 1 在大肠杆菌内乙酰化修饰的相关酶。但在本实验中,我们利用 Red 重组技术将大肠杆菌 BL21(DE3)中已知的乙酰转移酶基因 *rimL* 敲除,并在敲除菌中表达 T α 1 融合蛋白 T α 1-L12,结果发现 *rimL* 的敲除并没有消除 T α 1 的乙酰化修饰。相反,敲除菌中所表达的 T α 1 乙酰化修饰程度有所提高(由 50%提高到 80%

左右),其原因有待后续研究。

参考文献

- [1] 刘玉英. 胸腺素 α 1 的研究进展 [J]. 上海医药, 2003,24(5):211-216.
- [2] 赵永同, 石继红, 赵宁, 等. 胸腺素 α 1-硫氧还蛋白融合蛋白基因的表达及其生物学功能的初步研究 [J]. 药物生物技术, 2001,8(2): 67-71.
- [3] 许松山, 宣锺健, 马素永, 等. 用基因工程方法大量生产高活性的胸腺素 α 1[P]. 中国专利,CN1840682, 2006-10-04.
- [4] 金磊. N⁶-脱乙酰化人胸腺素 α 1 单体的表达载体、工程菌及其制备方法[P]. 中国专利,CN1316028B, 2007-05-16.
- [5] 程波, 段涛, 白凤武, 等. 培养基因工程菌表达未乙酰化胸腺素 α 1 的研究[J]. 化学与生物工程, 2007,24(8):48-51.
- [6] Polevoda B, Sherman F. N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins[J]. J Mol Biol, 2003,325(4):595-622.
- [7] Bradshaw R A, Brickey W W, Walker K W. N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families[J]. Trends Biochem Sci, 1998,23(7):263-267.
- [8] Tanaka S, Matsushita Y, Yoshikawa A, et al. Cloning and molecular characterization of the gene *rimL* which encodes an enzyme acetylating ribosomal protein L12 of Escherichia coli K12 [J]. Mol Gen Genet, 1989,217(2-3):289-293.
- [9] Ghigo J M. Lambda red-mediated Gene manipulation in Gram-negative bacteria: the 3-step PCR(3T-PCR) Protocol[Z]. Genetics of Biofilms Laboratory, Department of Fundamental and Medical Microbiology, Institut Pasteur. 2004.
- [10] Miao L, Fang H Q, Li Y, et al. Studies of the in vitro N alpha-acetyltransferase activities of E.coli RimL protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007,357(3):641-647.